

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-156504

(P2003-156504A)

(43) 公開日 平成15年5月30日 (2003.5.30)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト* (参考)
G 0 1 N 37/00	1 0 2	G 0 1 N 37/00	1 0 2 2 G 0 4 3
21/64		21/64	F
			G
33/543	5 9 5	33/543	5 9 5

審査請求 有 請求項の数14 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2001-356971(P2001-356971)

(22) 出願日 平成13年11月22日 (2001. 11. 22)

(71) 出願人 394023953

北陸先端科学技術大学院大学長

石川県能美郡辰口町旭台1丁目1番地

(72) 発明者 民谷 栄一

石川県金沢市平和町3-17-14 平和宿舎

C58棟-13号

(72) 発明者 村上 裕二

石川県能美郡辰口町旭台1-50 職員宿舎

D-33号室

(74) 代理人 100072051

弁理士 杉村 興作 (外1名)

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 CA03 DA02 EA01

GA07 GB21

(54) 【発明の名称】 バイオチップ、バイオチップアレイ、及びそれらを用いたスクリーニング方法

(57) 【要約】

【課題】 高分子に対しても的確に固定化でき、従来よりも簡便にスクリーニング可能なバイオチップ、及びバイオチップアレイを提供することにある。

【解決手段】 本発明のバイオチップは、溶液の屈折率より高い一定の屈折率を有する媒体を含む微小担体と、前記微小担体の一面に形成した疎水性部分と、前記微小担体の他の一面に固定化した認識物質とからなるバイオチップであり、前記一定の屈折率を有する媒体側から溶液側へ入射した電磁波を全反射させた場合に、前記溶液側にエバネッセント場を生じさせることが可能であることを特徴とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 一定の屈折率を有する媒体を含む微小担体と、前記微小担体の一面に形成した疎水性部分と、前記微小担体の他の一面に固定化した認識物質とからなるバイオチップであり、前記媒体側から媒体の屈折率より低い屈折率を有する媒体側へ入射した電磁波を全反射させた場合に、前記低い屈折率を有する媒体側にエバネッセント場を生じさせることが可能であることを特徴とするバイオチップ。

【請求項2】 前記エバネッセント場が生じる範囲内に、前記認識物質を備える請求項1に記載のバイオチップ。

【請求項3】 相を介して前記認識物質を固定化する請求項1又は2項に記載のバイオチップ。

【請求項4】 相の厚さが、100nm以下である請求項3項に記載のバイオチップ。

【請求項5】 前記認識物質が、タンパク質、脂質、生体模倣有機分子、細胞、及びこれらの複合体からなる群から選択されることを特徴とする請求項1～4項のいずれか1項に記載のバイオチップ。

【請求項6】 前記認識物質が被測定対象を認識し、認識物質-被測定対象との組み合わせが、酵素-基質、助酵素-酵素、抗原-抗体、リガンド-レセプター、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA、PNA-DNA、PNA-RNAからなる群から選択される少なくとも1種である請求項1～5項のいずれか1項に記載のバイオチップ。

【請求項7】 個々の前記バイオチップを識別するための識別子を、前記微小担体上に有していることを特徴とする請求項1～6項のいずれか1項に記載のバイオチップ。

【請求項8】 前記識別子が、前記微小担体上に記載された格子状のタグのパターンにより構成されていることを特徴とする、請求項7記載のバイオチップ。

【請求項9】 前記識別子が、前記微小担体の一定の屈折率を有する媒体の表面に形成された相上に存在することを特徴とする請求項7又は8項に記載のバイオチップ。

【請求項10】 前記相が、金、白金、銀、銅からなる群から選択される少なくとも1種からなることを特徴とする請求項3、4又は9項のいずれか1項に記載のバイオチップ。

【請求項11】 基板と、前記基板上に設けられた疎水性固定部と、バイオチップとを備えたバイオチップアレイであって、前記疎水性固定部は、その間が親水性である複数の疎水性固定部からなり、前記バイオチップが、請求項1～10項のいずれか1項に記載されたバイオチップであり、前記疎水性固定部と前記バイオチップとは疎水性相互作用により結合していることを特徴とするバイオチップアレイ。

【請求項12】 請求項11記載のバイオチップアレイ

を用いて、被測定対象をスクリーニングするスクリーニング方法。

【請求項13】 被測定対象が標識物質を有する請求項12記載のスクリーニング方法。

【請求項14】 前記エバネッセント場に生じた局所的な励起光による前記標識物質の蛍光を利用することを特徴とする請求項14記載のスクリーニング方法。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バイオチップ、バイオチップアレイ及びそれらを用いたスクリーニング方法に関し、特に、蛍光標識を利用したバイオチップ、バイオチップアレイ及びそれらを用いたスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】生体材料の固定化を利用する技術として、DNA/ペプチド/タンパク質などのバイオチップ、バイオセンサー等がある。これらの技術は、生体材料の優れた分子識別能力を利用している。例えば、バイオセンサーは、生体材料の分子識別能力を利用して化学物質の濃度を測定するものである。通常、バイオセンサーは検出対象とする化学物質を認識するレセプター部位と、そこに発生する物理的变化、化学的变化を電気信号に変換するトランスデューサー部位とから構成される。生体内には、互いに親和性のある物質として、酵素-基質、酵素-補酵素、抗原-抗体、ホルモン-レセプター、核酸の相互作用などがある。バイオセンサーは、これら互いに親和性のある物質の一方を膜に固定化して分子認識物質として用いることによって、対応させるもう一方の物質を選択的に計測することができるという原理を利用している。

【0003】近年、バイオセンサーのチャネル数を増やし、集積型にすることが望まれている。バイオセンサーのチャネル数を増やすことにより、種々の酵素基質、抗原、DNAなどを同時に測定可能となり、ひいては匂いや味などの複数からなる化学物質を測定することができるからである。

【0004】チャネル数を増やしたバイオセンサーの2つめの利点は、測定対象が分からない場合に測定対象を検出し得ることである。DNAを例として説明する。DNAはアデニン(A)、チミン(T)、シトシン(C)、グアニン(G)と呼ばれる4種類の塩基の配列からなっている。DNAを構成する塩基数が多くなればなるほど、情報の異なるDNAの種類が多くなる。DNA塩基配列測定用のセンサー構築では、これらの種類が異なるDNAをなるべく多く基板に配列する必要がある。測定するDNAは、AとT、GとCの鎖の相補的な結合により基板のある一個所に配置されることになる。つまり、測定対象が正確には判らないので、種類の異なるチャネルの数を多くし、測定対象が測定できる確率を上げることにより、測定対

象を検出し得ることとなる。

【0005】さらに、多項目を同時に測定し得るバイオセンサーに関する研究が行なわれている。バイオセンサーの例として、アフィメトリックス社によりDNAチップが開発されている。これはシリコン基板上でオリゴヌクレオチドを直接合成し、DNA分子を多数配列させたチップである。このチップを用いて測定することにより、対象の発現遺伝子を標識し、DNAチップにハイブリダイゼーションさせ固定化位置を確認することにより特定できる。このチップの特徴は、ゲルやキャピラリーを用いたものより測定時間が早く、標識の種類を変えれば同時にいくつものサンプルを測定できる点である。

【0006】また、DNAチップやプロテインチップを作製する方法として、幾つかの技術が現在用いられている。そのうち、幾何級数的種類の生体高分子オリゴマーの全種類を高密度に合成、配列できるフォトリソグラフィを利用した固相合成法が知られている。

【0007】また、あらかじめ用意した多種類の材料をチップ上に並べていく技術であるスタンプ法が知られている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】しかし、上述のDNAチップに関しては、このDNAチップを用いた特定センサーは、認識物質を逐次固定化しているので、チャンネル数が増えることによって、構築時間も増加し、また、配置操作にも精度を欠くという問題点がある。

【0009】上述のフォトリソグラフィを利用した固相合成法は、固相合成方法であるため長い鎖長のポリマーを得ることができず、蛋白質のような高次構造を有する材料の固定化方法には適用できないという。また、多種類のフォトマスクを利用する工程数の多い方法であるため、低コスト化には向いていない。

【0010】また、上述のスタンプ法は、任意の材料に適用できるが、個々の材料の固定は、物理・化学吸着か、簡単な条件で反応が進行する固定化法に限定される。したがって、タンパク質のような高分子に対しても的確に固定化でき、低コストで、かつ簡便に測定可能なバイオチップ、及びバイオチップアレイの開発が望まれていた。

【0011】そこで、本発明は、高分子に対しても的確に固定化でき、従来よりも簡便にスクリーニング可能なバイオチップ、及びバイオチップアレイを提供することにある。

【0012】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、発明者らは、高集積型バイオチップについて鋭意研究した結果、本発明のバイオチップ及びバイオチップアレイを見出すに至った。

【0013】本発明のバイオチップは、一定の屈折率を有する媒体を含む微小担体と、前記微小担体の一の面に

形成した疎水性部分と、前記微小担体の他の一の面に固定化した認識物質とからなるバイオチップであり、前記一定の屈折率を有する媒体側から媒体の屈折率より低い屈折率を有する媒体側へ入射した電磁波を全反射させた場合に、前記低い屈折率を有する媒体側にエバネッセント場を生じさせることが可能であることを特徴とする。

【0014】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、前記エバネッセント場が生じる範囲内に、前記認識物質を備えることを特徴とする。

【0015】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、相を介して前記認識物質を固定化することを特徴とする。

【0016】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、相の厚さが、100nm以下であることを特徴とする。

【0017】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、前記エバネッセント場が生じる範囲内に、前記認識物質を備えることを特徴とする。

【0018】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、前記認識物質が、タンパク質、脂質、生体模倣有機分子、細胞、及びこれらの複合体からなる群から選択されることを特徴とする。

【0019】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、前記認識物質が被測定対象を認識し、認識物質－被測定対象との組み合わせが、酵素－基質、助酵素－酵素、抗原－抗体、リガンド－レセプター、DNA－DNA、DNA－RNA、RNA－RNA、PNA－DNA、PNA－RNAからなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする。

【0020】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、個々の前記生体材料固定化担体を識別するための識別子を、前記生体材料固定化担体上に有していることを特徴とする。

【0021】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、前記識別子が、前記生体材料固定化担体上に記載された格子状のタグのパターンにより構成されていることを特徴とする。

【0022】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、前記識別子が、前記微小担体の低い屈折率を有する媒体の表面に形成された相上に有することを特徴とする。

【0023】本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、前記相が、金、白金、銀、銅からなる群から選択される少なくとも1種からなることを特徴とする。

【0024】また、本発明のバイオチップアレイは、基板と、前記基板上に設けられた疎水性固定部と、バイオチップとを備えたバイオチップアレイであって、前記疎水性固定部が前記疎水性固定部間が親水性である複数の疎水性固定部からなり、前記バイオチップが、請求項1～9項のいずれか1項に記載されたバイオチップであ

り、前記疎水性固定部と前記バイオチップとは疎水性相互作用により結合していることを特徴とする。

【0025】また、本発明のスクリーニング方法は、請求項11記載のバイオチップアレイを用いて、被測定対象をスクリーニングすることを特徴とする。

【0026】また、本発明のスクリーニング方法の好ましい実施態様において、被測定対象が標識物質を有することを特徴とする。

【0027】また、本発明のスクリーニング方法の好ましい実施態様において、前記標識物質が、前記エバネッセント場に生じた局所的な励起光による蛍光を利用することを特徴とする。

【0028】

【発明の実施の形態】まず、本発明のバイオチップについて説明する。本発明のバイオチップは、溶液の屈折率より高い一定の屈折率を有する媒体を含む微小担体を備える。この微小担体は、溶液の屈折率より高い一定の屈折率を有する媒体からなれば、特に限定されない。たとえば、一定の屈折率を有する媒体としては、ガラス、石英、樹脂等の比較的高い屈折率を有する媒体を挙げることができる。このような屈折率の媒体を用いるのは、エバネッセント場を利用した局所的な励起光による蛍光によっても、被測定対象の認識を行なえることをも想定したことによる。但し、このような構成を有するバイオチップを通常の蛍光によっても、測定可能であることはいうまでもない。

【0029】特に、エバネッセント場を利用した局所的な励起光を利用して、蛍光測定をする場合、媒体側から溶液側へ入射した電磁波を全反射させて、溶液側にエバネッセント場を生じさせることが可能である。エバネッセント場を生じさせるには、入射する電磁波を全反射させる必要がある。全反射させるには、一般に入射角 $\theta$ を $\theta > 42^\circ$ に設定する。全反射させると、溶液などの媒体より低い屈折率を有する側にエバネッセント場と呼ばれ

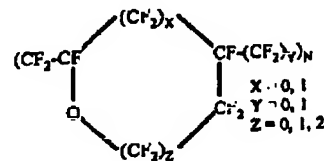
る近接場の一種がしみだしてくる。このエバネッセント場は、全反射を起こした界面の面内方向に伝搬するが、垂直方向には伝搬せず、界面付近に局在する。よって、エバネッセント場の生じた領域にのみ励起光が生じ、この場に蛍光標識があれば、この局所的なエバネッセント場でのみ蛍光を放出させることができる。

【0030】このような局所的な励起光を利用すれば、従来では、たとえば、結合した標識DNAと結合していない標識DNAとをわけてスクリーニングする必要があったために、洗浄操作を必須の要件としていたが、このような洗浄操作が不用となる。

【0031】また、本発明のバイオチップを構成する微小担体は、前記微小担体の一面に形成した疎水性部分と、前記微小担体の他の一面に固定化した認識物質とからなる。疎水性部分は、本発明のバイオチップを後述するようなバイオチップアレイに用いた場合に、バイオチップアレイの基板上的疎水性固定部と、疎水性相互作用により結合可能とするためのものである。

【0032】当該疎水性部分には、疎水性相互作用を与えることができる限り、種々の材料を使用する事ができ、特に限定される意図ではない。疎水性部分には、たとえば、環状パーフルオロポリマー、CYTOP等の疎水性材料を使用することができる。加工が容易で透明であるという観点から、疎水性部分には、CYTOPを用いることが好ましい。CYTOPの化学構造式を化1に、物理的特性を表1に、それぞれ示す。

【化1】



【表1】

事 項	値	付 記
電気的性質		
比誘電率	2.1~2.2	室温、60Hz~1MHz
誘電正接	0.0007	60Hz
体積抵抗率 ( $\Omega \cdot \text{cm}$ )	$>10^{17}$	室温
光学的性質		
屈折率	1.34	D線
可視光透過率 (%)	$>95$	200 $\mu$ シート、400~700nm
紫外光透過率 (%)	90	200 $\mu$ シート、250nm
機械的及び温度的性質		
ガラス転移点 (°C)	108	DCS
密度 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	2.03	25°C
水吸収率 (重量%)	$<0.01$	60°C、1週間
界面張力 ( $\text{dyne}/\text{cm}$ )	19	臨界面張力

【0033】また、好ましい実施態様において、前記エバネッセント場が生じる範囲内に、前記認識物質を備える。エバネッセント場が生じている範囲内に認識物質があれば、上述したような洗浄工程を省略できる利益を享受し得るからである。エバネッセント光は、光の全反射に付随して起こる表面波であり、その強度は表面からの距離に対して指数関数的に減少するという特徴を有する。このエバネッセント光は、一般的に、全反射の生じた界面から100nm以下の厚みを持つ光であり、これによって、バルクではなく認識物質によって表面に局在化した被測定対象の蛍光標識を励起することが可能となる。

【0034】ここで、認識物質の固定化法は、特に限定されるものではない。たとえば、酵素を例にすると、共有結合、イオン結合、吸着などにより担体に結合させる担体結合法、酵素同士を共有結合でつなぐ架橋法、高分子の網目構造の中に酵素を閉じ込める包括法などを挙げることができる。また、相を介して固定化させても良い。相については、具体的に、生体物質を固定化することが可能であれば、特に限定されない。例えば、生体物質との結合を可能とするチオール基等を導入し得る相が望ましい。

【0035】相の厚さは、通常の蛍光測定を行なう場合には、特に限定されないが、エバネッセント光を利用した蛍光測定を行なう場合には、100nm以下が好ましい。これはエバネッセント光が、全反射の生じた界面から約100nm以下の厚みを持つ光であり、このエバネッセント光のどく局所領域に被測定対象が存在するようにするためである。相の厚さは、エバネッセント場の強度を考慮すると、好ましくは、100nmである。

【0036】また、前記認識物質は、好ましくは、タンパク質、脂質、生体模倣有機分子、細胞、及びこれらの複合体からなる群から選択することが可能である。当該

認識物質が、被測定対象を認識するしくみは、生体材料の優れた分子識別能力を利用していることに基づく。すなわち、生体内には、互いに親和性のある物質として、酵素-基質、酵素-補酵素、抗原-抗体、リガンド-レセプターなどがあり、互いに相補的な関係で結合能を有することを利用している。被測定物質と認識物質の組み合わせには、例えば、酵素-基質、助酵素-酵素、抗原-抗体、リガンド-レセプター、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNA、ペプチド核酸(以下、PNAという)-DNA、PNA-RNAなどを挙げることができる。但し、本発明は、これらの組み合わせに限定される意図ではない。

【0037】ここで、生体模倣有機分子について補足説明すると、生体模倣有機分子とは、生体機能材料が持つ特異的認識能や、信号変換機能などに相当する機能を発現するか、もしくは安定化や信号伝達のように他の機能を支援する分子を含む。認識能を有する分子としては、精密合成による認識分子やモレキュラーインプリンティング法によって得られた分子認識ポリマー、分子認識能を目的として得られるコンビナトリアル化学の産物などがある。信号変換機能を有する分子としては、触媒能を有する分子、光学特性が変化する分子、酸化または還元されうる分子、重量変化を起こす分子などがある。支援機能を有する分子としては、疎水場、または親水場などにより他の生体材料を安定化させる分子のほか、固定化を仲介する分子、電子伝達する導電性分子などがある。したがって、このような生体模倣有機分子を認識物質として用いた構造より成るパターン化基板及びバイオチップもまた、本発明の範囲内である。

【0038】そして、本発明のバイオチップの好ましい実施態様において、被測定対象が標識物質を有する。標識物質を有することで、被測定対象のスクリーニングが可能となる。この標識物質は、エバネッセント場を生じ

る範囲内にあれば、前記標識物質が、前記エバネッセント場に生じた局所的な励起光により蛍光する。標識物質としては、ローダミン、フルオレセイン、Cy3、Cy5などを挙げることができる。

【0039】さらに、本発明において、個々の前記生体材料固定化担体を識別するための識別子を、前記バイオチップ上に有してもよい。すなわち、バイオチップに何らかの識別子を持たせることもまた可能である。ここで「識別子」とは、前記チップの区別を可能とするために前記担体上に記載された指標を、包括的に意味するものである。

【0040】生体材料を固定化したバイオチップに識別子を付与すれば、各々のバイオチップが、バイオチップアレイ上のどの位置に配置されたかを的確に把握することができる。このような識別子を用いれば、本発明の有用性は更に高くなる。

【0041】通常、バイオチップアレイは、微小領域に高集積にすることを目的とするため、チップ自体も極めて小さいものとなる。それゆえ、識別子自体も微小とする必要性が生じる。

【0042】したがって、紫外線リソグラフィー、X線リソグラフィー、電子ビームリソグラフィー、レーザーパターンニング、集束イオンビームパターンニング、スクリーン印刷、スタンプなどの技術を利用して、識別子をバイオチップに書き込むことが想定される。但し、上述の技術に限定されるものではなく、バイオチップに識別子を記載することができる限り、どのような手段を用いても良い。

【0043】識別子を構成するタグの種々のパターンは、フォトリソグラフィーの手法によって微小担体を部分的に取り除くことにより書き分けることができる。このような識別子のパターンは、微小担体上に形成した薄膜等の相を利用して書き分けることもできる。すなわち、薄膜を削って識別子を形成することも容易に可能である。そのパターンの配列の組み合わせを読み取ることにより各微小担体が、バイオチップアレイ上のどの位置に固定されたかを簡単に把握することができる。

【0044】このような薄膜としては、特に限定されないが、金、白金、銀、銅などを挙げることができる。

【0045】識別子のパターンとしては、たとえば、格子状の微小タイルから成るタグを用いて、1つの微小タイルを1ビットとしてタイルの有無のパターンを二進法の数字に変換して書き込んだものを例示することができる。理解しやすいように、図2を用いて説明する。図2(a)~(c)は、微小タイル8個からなる識別子の一例を示す図である。

【0046】図2(a)は、タグにおける各ビットの数字であり、リソグラフィーによりバイオチップにそのタグを書き込んだものを模式的に示している。1つの微小タイルが1ビットを意味するとした場合には、この8ビ

ットにより0~255を表すことが可能である。SPとEPはビットの出発点と終末点を表し、バイオチップに常に書かれている。図2(b)は図2(a)に基づいたタグであり、2進法の010110001(10進法の数字でいうと88)を示している。また、図2(c)はバイオチップのSEM写真であり、図2(b)の"010110001"という数字がリソグラフィーによってバイオチップ上に書かれており、ダイシングマシン等により分割することが可能である。

【0047】以上の説明は、本発明のバイオチップ等を使用可能な識別子の一例を示すものであるが、これに限定されず、識別子は、その他の様々な構成をとることが可能である。例えばバーコードの様に並列に配置している複数の線の組み合わせを用いて、それらの線の太さにより識別させることもまた可能である。バイオチップ上に記載することが可能であって、個々のバイオチップを特定する機能を有する限り、どのような手段によりパターンを書き分ける方法を用いても、本発明の範囲内である。

【0048】また、リソグラフィー等の手段により記載される2次元形状の特徴により識別する手段は、全て本発明の範囲内であると理解されるべきである。即ち本発明の識別子は、太さ、長さ、大きさの違う図形、またはその組み合わせ、文字、文字に類する形状等により記載されてもよい。更に2次元形状のみならず、エッチング深さの様な3次元形状の他、担体上への堆積や固定化あるいは担体の表面改善によって得られる薄膜の形状、厚み、材質、およびそれらの組み合わせに伴う特徴によって識別する「識別子」によっても本発明の目的を達することが可能であり、本発明の範囲内であると解されるべきである。

【0049】次に、本発明のバイオチップアレイについて説明する。本発明のバイオチップアレイは、基板と、前記基板上に設けられた疎水性固定部と、バイオチップとを備えたバイオチップアレイである。バイオチップについては、上述したバイオチップをそのまま適用することができる。したがって、上述のバイオチップの説明をそのまま引用してバイオチップアレイに当てはめることができる。

【0050】基板としては、特に限定されず、一般にバイオチップアレイに用いるもの、たとえば、ガラス、石英、樹脂等を挙げることができる。

【0051】基板上に設けられた疎水性固定部は、主として認識物質を有するバイオチップを固定化するためのものである。当該疎水性固定部には、疎水性相互作用を与えることができる限り、種々の材料を使用する事ができ、特に限定される意図ではない。疎水性固定部には、たとえば、環状パーフルオロポリマー、CYTOP等の疎水性材料を使用することができる。加工性と透明度という観点から、疎水性固定部には、CYTOPを用い

ることが好ましい。

【0052】また、前記疎水性固定部は、前記疎水性固定部間が親水性である複数の疎水性固定部からなる。親水性としたのは、バイオチップの当該疎水性固定部に確実に結合し、固定化されるようにするためである。また、複数の疎水性固定部を形成することにより、より高集積型のバイオチップアレイを実現できる。より固定化を強めるという観点から、パターン化基板を凹凸に設けて、凹部を疎水性とすると、バイオチップが当該凹部に入り込んで固定化されることも可能である。

【0053】ここで、本発明のバイオチップアレイの構造の一例を、図1に示す。パターン化基板は、スライドガラス等の基板(1)上に、疎水性固定部(2)が複数存在しているという構造をしている。パターン化基板は、親水性部分(8)の間に疎水性部分(9)が格子状に配列されている、という構造となっている。一方、生体材料固定化担体は、疎水性コーティング(3)、カバーガラス等の微小担体(4)、クロム等の層(5)、金等の認識物質固定化層(6)及び認識物質(生体材料など)(7)の順番に層を形成している。ここで、微小担体(4)の大きさは約10～500 $\mu$ mで、厚さは1～120 $\mu$ mであることが望ましい。また、疎水性コーティング(3)の厚さは1分子層～約1.0 $\mu$ m、クロム等のコーティング(5)の厚さについては、1000オングストローム以下の薄い相が望ましく、好ましくは、約200オングストローム以下であり、金等の認識物質固定化層(6)の厚さは、好ましくは、約2000オングストロームである。更に、基板(1)の厚さは約0.5～5mm、疎水性固定部(2)の厚さは1分子層～約2.0 $\mu$ mであることが望ましい。疎水性固定部(2)と疎水性コーティング(3)は、疎水性相互作用により結合しており、上述した無作為液中自己組織化法によって、パターン化基板に生体材料固定化担体が結合したバイオチップを作製することができる。無作為液中自己組織化法の原理より、微小担体(4)の大きさと疎水性固定部(2)の大きさはほぼ等しくなるように作製することが好ましい。これは、疎水性固定部に1つの微小担体を固定化するためであり、この要件を満たせば、疎水性固定部より小さい微小担体を用いても良い。

【0054】本発明のバイオチップとバイオチップアレイの製造方法について簡単に説明すると以下のようである。

【0055】上記のバイオチップは、たとえば、以下の様な過程で作製することができる。

(1) 微小担体の片面の表層を、疎水性コーティングした後焼成を行う。

(2) 前記微小担体の疎水性コーティングを行わなかった面に、例えばクロム等の媒体を蒸着してクロム蒸着層を形成する。クロムで蒸着を行うのは、金はガラスに対する付着性が良くないために、金等の認識物質固定化層

の前にクロムの蒸着層を作製する必要があるからである。

(3) 前記クロム蒸着層の上に認識物質を固定化できる層を形成する。認識物質を固定化できる層としては、金、白金、銀、銅などの相からなる蒸着層を形成しても良い。なお、金の蒸着層には、微小担体に識別子を微細加工技術により容易に記載することができるという利点もある。

(4) 微小担体に切断する。

(5) 次に、認識物質を微小担体に固定化する。固定化の方法は特に限定されず、従来を使用することができる。固定化の一例を説明すると、まず、前記蒸着層をジチオジプロピオン酸等の基板に対する官能基導入剤で処理し、更にエチルージメチルアミノプロピルカルボジイミド等の官能基活性化剤で処理を行なう。この後、分子識別能力を有する物質、例えばアビジンを作用させることにより、アビジンで修飾した金の層を形成する。

(6) 前記アビジンで修飾した金の層にビオチン化した認識物質を結合させる。

【0056】さらに微小担体への認識物質の固定化方法の概要について補足説明すると、以下のようになる。金をジチオジプロピオン酸で処理を行うことにより、チオール基を介してジチオジプロピオン酸は金と結合する。その後、ジチオジプロピオン酸とエチルージメチルアミノプロピルカルボジイミドを反応させることにより、イミドを結合させる。更にアビジンと反応させるとイミドが遊離して、ペプチド結合を介してアビジンが金蒸着層の上に結合する。このような反応を用いて固定化したアビジンにビオチン化DNAを作用させると、ビオチン-アビジン親和性相互作用により、微小担体上にDNAが固定化される(図3)。この様にして固定化したDNAにフルオレセイン・イソチオシアネイト(FITC)等の標識物質でラベル化したDNAが結合すると、FITCの蛍光により検出することが可能である。また、同様の反応を用いて、DNAのみならず、ポリペプチドを固定化することも可能である。

【0057】また、上記のバイオチップアレイは、たとえば、以下の様な過程で作製することができる。一例を挙げると、

(1) スライドガラス等の基板の片面の表層を、疎水性コーティングした後焼成を行う。

(2) 前記カバーガラスの疎水性コーティングを行った面にクロムを蒸着してクロム蒸着層を形成する。

(3) 前記クロム蒸着層の上に、後述する酸素プラズマ処理でのマスク材料となる層、たとえば、金、アルミニウムなどの蒸着層を形成する。

(4) 前記金蒸着層にフォトレジストを作用させ、露光した後現像を行う。これにより、パターン化基板の形状をプリントしたフォトレジスト層を作製することができる。そのため、後述する金蒸着層のエッチングを行っ

た際に、感光していない部分のみが除去され、パターン化基板の形状のプリントの通りに溝が形成される。

(5) 酸素プラズマ処理によってレジストと親水化処理を行なう。

(6) マスク材料とクロム蒸着層をエッチングする。この一連の操作で、酸素プラズマ処理を直接受けることのなかったサイトップ層が現れた疎水性サイトと、サイトップ上にクロム、金、酸素プラズマ処理による親水化処理を受けたレジスト層の多層構造になって入る親水性の壁構造が作成される。

【0058】フォトレジストを除去した後に、クロム蒸着層及び疎水性コーティングのエッチングを行って、それから、残った金蒸着層とクロム蒸着層を除去すると、疎水性コーティングされたサイトと疎水性コーティングされていない溝だけが残し、パターン化基板が作製される(図4)。

【0059】更に、無作為液中自己組織化法を用いて、上記の方法により作製したバイオチップとパターン化基板とを疎水性相互作用によって固定化することにより、バイオチップアレイを作製することができる。ここで、無作為液中自己組織化法とは、液体中でこのサイト付近に先の担体懸濁液を滴下し、重力、遠心力、疎水性相互作用また種々の親和力によって1つのサイトに一つだけの担体を配置させる方法である(図1)。たとえば重力や疎水性相互作用によって、サイトの中に、ほぼそのサイトと同じ大きさの担体を落とし込むと、2つ目以降は入ることができない。基板上に多くのサイトを用意して十分な数の担体を滴下すると、一度に数多くのサイトに担体を配置させることが可能であり、この様な方法を自己組織化法という。懸濁液に化学的、生化学的に性質が異なる生体材料を固定化した担体の混合物を用いれば、最終的に多種類の生体材料を密に固定化した基板を得ることができる。このとき特定の認識物質を固定化した担体が基板上のどこに配置されるかは制御されていないので、本発明の方法においては無作為に固定化される。本発明の方法において、センサー応答のキャリブレーション等によって、最終的な位置を知ることが可能となる。この様に、生物材料を固定化した微小担体と基板とを結合させるにあたり、無作為液中自己組織化法によって疎水性相互作用を利用して結合させた事が特徴の1つである。

【0060】パターン化基板上に作製した疎水性被覆のパターンの大きさは、バイオチップとほぼ同一であるので、1つの基板パターンには1つの微小担体しか結合しない、という特質を有する。

【0061】また、このような方法によれば、バイオチップが無作為に固定化されることから、バイオチップに上述したような識別子をもたせれば、バイオチップがパターン化基板上のどの位置に固定化されたかを把握することができる。

【0062】

【実施例】ここで、本発明の一実施例を説明するが、本発明は、下記の実施例に限定して解釈されるものではない。また、本発明の要旨を逸脱することなく、適宜変更することが可能であることは言うまでもない。

【0063】実施例1

(試薬) CYTOP (cyclized perfluoropolymer (CPFP) の商品名、型番: CTL-809M) またCYTOP溶液剤の(C4 F9)N (型番: CT-Solv180) は旭化成のものを用いた。3, 3'-ジチオジプロピオン酸は、PFALTZ & BAUER社のものを用いた。基板超音波洗浄用のアセトン、NHS (N-ヒドロキシコハク酸イミド)、アビジン (分子量67000、卵白由来)、トリス、塩化ナトリウム、エタノール、ヨウ化カリウム、水酸化ナトリウム、フェリシアン化カリウムは和光純薬工業のものを用いた。EDC (塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド) は東京化成工業のものを用いた。

【0064】認識物質としては、5' 末端に各々ビオチン及びビロードミンを修飾した0.2  $\mu$ Mスケールの二重螺旋DNAをニッシンボーに委託合成したものを用いた。用いたDNAの塩基配列は、5' Bio-TGCAGAGTGGTATAACTG-3' (プローブPB-1)、5'-CAGTTATACCACTCTGCA-3' (PB-1に相補的な塩基配列(CR-1))、5'-GGTTTCCATGACAACGGA-3' (MR-1)、5'-CAGTTATAGGACTCTGCA-3' (MR-2)、5'-CAGTTATACCACTCTGGG-3' (MR-3)である。ポジ型レジストのOFPR-800とその専用現像液のNMD-3; 2.38 (産業用) は東京応化工業のものを用いた。ヨウ素は岸田化学のものを用いた。基板洗浄用溶媒には、電子工業用 (関東化学) アセトンを、その他の試薬には化学・生化学用特級またはその相当品を用いた。水はクリーンルームプロセスでは超純水 (18.0 M $\Omega$ ·cm) を、その他の場合は蒸留水 (49.5  $\times 10^{-6}$  S·cm, pH4.86) を用いた。

【0065】(カバーガラスの微小加工およびパターン化した基板の作製) カバーガラス基板4の微小加工の微細加工についての模式図を、図5に示した。まず、カバーガラス基板4 (0.10~0.12mm、18mm $\times$ 18mm、西ドイツ) の表面は超音波洗浄器 (W-222、Honda) を用いて純水、アセトン、純水の順にそれぞれ30分間洗浄した(図5(a))。そして、カバーガラス基板4の片面はスピンコーター (1H-D3、MIKASA) により500rpmで10秒、1000~4000rpmで20秒にして、(C4 F9)Nの溶液剤で0.45~9重量%の濃度に希釈させたCYTOP5をピペットで100 $\mu$ L滴下させることによって

0.5~2.0  $\mu\text{m}$ の厚さでコーティングして疎水性にした(図5(b))。

【0066】次に、115℃の恒温オーブン(DS64、ヤマト科学)の中に入れて4時間ハードベキングした。そして、その反対面上にタングステンボートを用いる抵抗加熱型の小型真空蒸着装置(SVC-700TURBO-TM、サンユウ)を用いてクロム6を厚さ約200オングストローム蒸着し(図5(c))、その後真空を破ることなく続けて金7(純度99.99%、フルヤ金属)を厚さ約2000オングストローム蒸着した(図5(d))。膜厚は水晶振動子(6MHz PKG10、LEYBOLD INFICON)を用いる膜厚モニター(TM-200R、Maxtek)で測定し、蒸着速度をクロムの場合は0.5~1.0オングストローム/sで、金の場合は5.0~10.0オングストローム/sの範囲になる様に調節した。真空度はイオン真空ゲージ(ULVAC GI-TL3)で測り、 $10^{-6}\text{torr}$ から開始した。蒸着後、アニーリング等の処理は施さなかった。

【0067】そして、カバーガラスを粘着性のダイシングテープ(Adwill D-210、LINTEC)に付けた後ダイシングマシン(A-WD-10A、東京精密)を用いてダイヤモンドカッタ(52D-0.1T-40H、アサヒダイヤモンド)で0.5mm/sの速度で純水を注ぎかけながら100~400 $\mu\text{m}$ 角の大きさに切り分けて微小担体を作製できた(図5(e))。その後、5分間ダイシングテープにUV照射して粘着性をUV照射前19600mN/25mm(カタログ値)からUV照射後250mN/25mmに落として担体を取れ易くした。

【0068】ここで、ビオチン化DNAの微小担体への固定化について説明する。金蒸着のカバーガラス基板上に、図3のような過程でチオール誘導体およびアビジンを介して5'末端にビオチン修飾したDNAを固定した。まず、1mM濃度の3,3'-ジチオジプロピオン酸水溶液3mLの中に金蒸着のカバーガラスを室温で20分間浸した。水溶液に100mg/mLの濃度にしたNHSとEDCを混合液としてカルボキシル酸と30分反応させた後乾燥させた。アビジンを緩衝液(pH7.9、10mMトリス-塩酸、0.2M塩化ナトリウム)で0.2mg/mLとなるように調製した1mLの溶液に1時間浸して置いた。1M濃度のエタノールアミン水溶液1mLにカバーガラスを30分間浸して未反応のカルボキシル基を不活性化した。アビジン修飾した金を緩衝液(pH7.9、10mMトリス-塩酸、0.2M塩化ナトリウム)にビオチン化DNAを1 $\mu\text{M}$ になるようにした1mLの溶液に25℃で30分間浸して置いた。ここで、ビオチン化DNA鎖はアビジン分子の4つの結合サイトの1つと結合する。ビオチン化DNAの固定量はDNA溶液に浸す時間により制御できた。

【0069】以上のような工程を経て、チオール誘導体およびアビジンを介して5'末端にビオチン修飾したDNAを固定した1000~8000個位の微小担体を作製することができた(図5(f))。

【0070】パターン化した基板の作製についての模式図を図4に示した。まず、マイクロスライドガラス基板(1.2~1.5mm、76mm×26mm、S-1225、マツナミガラス)をダイヤモンドカッターで3等分した後その表面は超音波洗浄器を用いて純水、アセトン、純水の順にそれぞれ30分間洗浄した。そして、スライドガラスの片面にスピンコーターにより500rpmで10秒、1000~4000rpmで20秒間、( $\text{C}_4\text{F}_9$ )Nの溶剤液で9重量%の濃度に希釈させたCYTOPをピペットで100 $\mu\text{L}$ 滴下することによって、0.5~2.0 $\mu\text{m}$ の厚さで疎水性にコーティングした。

【0071】次に115℃の恒温オーブン中に入れて4時間ハードベキングした。この上にクロムと金を各々約200オングストロームと2000オングストロームに蒸着した。

【0072】金を蒸着したスライドガラス基板に対し、クラス10のクリーンルームでボジ型のフォトレジストのOFPR-800を7~8滴落としてスピンコート(1H-DXII、ミカサ)し、(1回目:500rpm/10秒、スロープ:10秒、2回目:4000rpm/20秒、スロープ:5秒)、プリベーク(80℃、30分)(DK300、ヤマトサイエンティフィック)の後、マスクアライナー(MJB3 UV400、Karl Suss)を用いて8秒間露光し、現像液のNMD-3に30秒間浸して現像した後、超純水で2度洗い流した後窒素ガスを吹かして乾燥させた。

【0073】ポストベーク(80℃、30分)の後、金のエッチング液(ヨウ化カリウム40g、ヨウ素10g、水400mL)で金のエッチングを行い、超純水で2度洗い流した後窒素ガスを吹かして乾燥させた。ついで、アセトン洗浄でフォトレジストを除去した後2度洗い流した後窒素ガスを吹かして乾燥させた。続けて、クロムのエッチング液(水酸化ナトリウム40g、フェリシアン化カリウム100g、水400mL)でクロムのエッチングを行い、超純水で2度洗い流した後窒素ガスを吹かして乾燥させた。また、 $2 \times 10^{-5}\text{Torr}$ 以下で酸素プラズマ(ISCAM、500V、イオン化密度1.0mA/cm<sup>2</sup>以下、RF power 100W)(EIS-200ER、ELIONIX)を2分間照射することによりCYTOPをエッチングさせた。再び、残っているクロムと金を全部エッチングさせた。この工程によりスライドガラスの片面に親水性および疎水性部分に分けて数多くのサイトを作製することができた。

【0074】(パターン化した基板上への担体の固定)

パターン化した基板上に微小加工した担体を疎水性相互作用による無作為液中自己組織化法で付けるため図1の様にシャーレを載せ、その中央部にパターン化した基板を固定してから純水を貯めた。ここに150-400個の担体を入れ、ピペティングにより懸濁させると担体が重力、遠心力および疎水性相互作用による担体群の無作為液中自己組織化によりパターン化した基板に付いた。

【0075】図1は、無作為液中自己組織化法を用いた疎水性相互作用によるパターン化した基板への担体の固定化により作製した、DNAチップアレイの模式図を現わす。パターン化した基板の疎水性部分にビオチン化DNA修飾した担体の疎水性部分が疎水性相互作用により数多くの所で付いてDNAチップアレイになる。

【0076】一方、懸濁液に化学、生化学的に性質が異なる生体材料を固定化した担体の混合物を用いれば、最終的に他種類の生体材料を密に固定化したDNAチップアレイを得ることができる。作製したDNAチップアレイに図3の最後の部分のようにビオチン化DNA修飾した担体に緩衝液(pH7.9、10mMトリス塩酸、0.2M塩化ナトリウム)にローダミン修飾したDNAを適当な濃度にして1mLの溶液に60℃で30分間浸して置いて二重螺旋を結合させた。二重螺旋DNAが結合したかは暗室でローダミン用蛍光フィルター付きの蛍光顕微鏡(励起光450~490nm、吸収光515~565nm、分光510nm)(LEICA MZ FLII, Leica)で励起させると蛍光が確認でき、その明るさによっても濃度がわかる。

【0077】(エバネッセント蛍光顕微鏡)エバネッセント蛍光顕微鏡は、この基板表面近傍に存在する光で表面に親和性がある分子の蛍光ラベルを励起する顕微鏡である。エバネッセント蛍光顕微鏡を用いて、エバネッセント場での局所的な励起光による蛍光のみを把握すれば、洗浄操作を必要とせず、認識物質と被測定対象との相互作用を2次元の広がりを持ってリアルタイムに測定することができる。

【0078】ここで使用したエバネッセント顕微鏡(図6)を用いたスクリーニング試験においては、YAGレーザーの光(532nm)を、正立蛍光顕微鏡の斜め下から、ステージ部分に配した台形プリズムに入射させておこなった。レーザー出力は10mW、10×の対物レンズを使用した。

【0079】かかる条件下で、DNAをバイオチップアレイに固定化・配置後、種々の濃度のローダミン修飾した相補配列のDNAを添加し、エバネッセント蛍光顕微鏡で観察したところ蛍光現象が確認できた。CCDカメラで積算取り込みを行った後、その強度を数値化した。

【0080】そして、種々のターゲットDNA(5'-CAGTTATACCACTCTGCA-3'(PB-1に相補的な塩基配列(CR-1))濃度での蛍光強度の時

間変化を見た(図7)。図7(a)は、被測定対象としてCR-1を、1μM、0.1μM、0.01μM、1nM、0.1nM、0.01nM、1pMの濃度での蛍光強度の時間変化を調べた結果を示す。図7(b)は、濃度に対する蛍光強度の関係を示す。測定条件は、温度は室温で、サンプルの拡散量は400μlであった。

【0081】その結果、時間に応じて徐々にDNAのハイブリッド化が進み表面のローダミン濃度が高まり蛍光強度が増加するという現象を支持する結果を得ることができ、また、濃度依存性があることが判明した。

【0082】これが非特異的吸着現象に起因するのかどうかを調べるため、相補的でない配列のターゲットDNAを用意して同様の分析を行った。相補的でないターゲットDNAとして、5'-GGTTTCCATGACAACGGA-3'(MR-1)、5'-CAGTTATAGGACTCTGCA-3'(MR-2)、5'-CAGTTATACCACTCTGGG-3'(MR-3)を用いた。その結果を図8に示す。図8(a)は、種々の被測定対象を用いた場合の蛍光強度と時間との関係を示し、図8(b)は、種々の被測定対象を用いた場合の蛍光強度と濃度との関係を示す。その結果、18merのターゲットDNAで6merしか一致しない配列MR-1は最も小さな変化を示した。一方、中央部に2merのみのミスマッチを有する配列MR-2と、3'末端に2merのミスマッチを有する配列MR-3とを見ると、完全に相補的なCR-1ほどではないものの、MR-1よりも大きな蛍光強度変化が観察された。この場合はミスマッチが末端に存在する方が親和性が高いという結果を示した。

【0083】以上の結果からこの蛍光はエバネッセント場で励起された蛍光であり、その強度変化はDNA相補鎖の認識によるものであるといえる。本研究ではDNA相互作用を用いたものの、原理的に本法は生体材料を限定しない方法であり、その用途は広いと推測される。

#### 【0084】実施例2

実施例2において、個々のバイオチップがバイオチップアレイ上のどの位置に固定化されたかを把握することを可能とする識別子を付与したバイオチップの作製を試みた。

【0085】(微小担体の作製)微小担体を作製するカバーガラス(0.04~0.06mm、30mm×30mm)を、超音波洗浄器を用いて純水、アセトン、純水の順にそれぞれ30分間洗浄した。カバーガラスの一方をCYTOP(9.0重量%、0.5μm)でスピコートした。カバーガラスを115℃で4時間ベーキングした。クロム層(0.5~1.0オングストローム/s、200オングストローム)と金層(5.0~10.0オングストローム/s、2000オングストローム)を、もう一方の面に蒸着した。フォトリソグラフィーを用いてネガ型のフォトリソレジスト(OMR83)を作用させて微粒子にタグを与え、ホットプレート上で100℃

で1分間ベーキングした。フォトマスクを通じて、UV光 (MJB3 UV400、カールザーツ) をレジスト膜に4秒間照射した。OMR現像液で現像し、洗浄して窒素ガスで乾燥させた。100℃で1分間ベーキングした後、金のエッチング液 (KI : I<sub>2</sub> : H<sub>2</sub>O = 4 : 1 : 40) とクロムのエッチング液 (NaOH : K<sub>3</sub> [Fe (CN)<sub>6</sub>] : H<sub>2</sub>O = 2 : 5 : 20) の中で30秒間エッチングを行った。剥離したOMR層のエッチングを行い、金表面を酸素プラズマ (67 Pa, 100 SCCM, 200 W) に5分間暴露して親水性とした。切断するために、カバーガラスを粘着テープに固定した。ダイシングマシンを用いて、カバーガラスを100~400 μmの微小担体に切断した。UV光を粘着テープに5分間照射して、微粒子を剥離した。この過程によりタグを付した微小担体を得られた。

【0086】(DNAの固定化) 実施例1と同様の方法で、金蒸着を行ったカバーガラス基板上にビオチン修飾したDNAを固定した。1 mM濃度の3, 3'-ジチオジプロピオン酸水溶液3 mLの中に、金蒸着したカバーガラスを室温で20分間浸した。金の上のカルボキシル酸をEDCの存在下でNHSと反応させた後に乾燥した。活性化したカルボキシル基を有する金を、1 mLのアビジン (100 μg/mL) の緩衝液 (pH 7. 9、10 mM トリス-塩酸、0. 2 M 塩化ナトリウム) 中に1時間浸した。何回か水溶液で洗浄しても、金からアビジンは除去されなかった。アビジンが結合した金を、エタノールアミン (1 M) の水溶液 (1 mL) に30分間浸して、カルボキシル基を不活化してβ-ヒドロキシエチルアミドにした。コントロール実験として、アビジンの緩衝液 (1 mL 中 10 μg) の中にそのままの金を浸したところ、アビジンの吸着はほとんど観察されなかった。アビジンの濃度を1 mL 中において30~200 μgまで増加したところ、非特異的な吸着が観察された。アビジンが結合した金を、ビオチン化したDNAの緩衝溶液 (20~21 bp, 1 μM) 1 mL 中に25℃で30分間浸した。固定化量をコントロールするために金を取り出した。アビジン分子の4つの結合サイトの1つと結合するとして、ビオチン化したDNA鎖を計算した。ビオチン化DNAの固定量はDNA溶液に浸す時間により制御できた。

【0087】(パターン化した基板の作製) スライドガラスを、超音波洗浄器を用いて純水、アセトン、純水の順にそれぞれ30分間洗浄した。そして、スライドガラスの片面をCYTOPによりスピコートして、115℃で4時間ベーキングした。クロム/金層をCYTOP上に蒸着し、ホットプレート上で200℃で15分間ベーキングしてこの表面を乾燥させた。ネガ型フォトレジスト (XP SU-8 50) を、スピコーターによりスライドガラス上に滴下し、ホットプレート上で100℃で30分間ベーキングした。フォトマスクを通じて

スライドガラスをUV光に20秒間暴露した。ホットプレート上において100℃で30分間ベーキングし、自然に冷却した。SU-8現像液中で30分間現像し、現像液で洗浄し、窒素ガスで乾燥した。SU-8 50の表面を酸素プラズマに5分間暴露し、親水性とした。金とクロムの層を30秒間エッチングし、洗浄して窒素ガスで乾燥した。パターン化した基板は、25~30 μmの厚さの壁を有する格子縞模様であった。大きさは、全ての側において100 x 100~500 x 500 μm<sup>2</sup>である。パターン化した基板はそれぞれ、親水性と疎水性の部位に分けられた。10<sup>3</sup> ~ 10<sup>4</sup> /cm<sup>2</sup>の親水性及び疎水性部位が得られた。

【0088】図9は、リソグラフィと酸素プラズマプロセスにより作製された、パターン化基板を示す。星印で示した範囲は親水性の部分を、残りは疎水性の部分を示す。このパターン化基板は100 x 100 μm<sup>2</sup> (10000サイト/cm<sup>2</sup>) であった。高さが25~30 μmの壁を全ての側面に規則的に作製したために、配列した後の微小担体の安定性は高いであろうと予測される。また、500 x 500 μm<sup>2</sup> のパターン化基板を作製することも可能であった。図9 (a) は作製された壁の拡大図であり、親水性部分と壁との間のエッチングが巧みであることが示されている。壁を明確に見ることができ、またフォトリソグラフィを用いて、種々の大きさの疎水性部位を得ることができる。

【0089】(担体のパターン化した基板上への配置) 種々の固定化DNAとタグの両方を有する約5000個の担体を含む懸濁液 (エタノール90%+蒸留水10%) の中に、パターン化した基板を入れた。重力と疎水性相互作用により、無作為液中自己組織化を用いて微小担体を基盤に付着させ、パターン化基板の疎水性部位の各々に無作為に配列した。この過程により、集約型のDNAチップマイクロアレイを組み立てることができた。

【0090】図10は、無作為液中自己組織化を用いて、疎水性相互作用によりタグを有する担体をパターン化基板上に配列させた、集積型DNAチップマイクロアレイのSEM写真を示す。星型と四角型の各部位はそれぞれ、親水性と疎水性の部位を示す。微小担体がパターン化基板上の疎水性部位に配列する確率は約75~85%であった。図10において担体の厚さは約50 μmであり、周囲に壁 (25~30 μm) があるために、担体は強固に三次元的に配列することができる。各担体をタグによって区別することができるために、多くの種類のDNAが担体に固定化されたときに各DNAを区別することが可能となる。タグの例として、2進法の"01011000"というタグや"01100011"というタグが挙げられ、これらは10進法の88という数字と99という数字を、それぞれ示している。

【0091】したがって、識別子を用いれば、バイオチップがバイオチップアレイのどの位置に固定化されたか

を的確に捉える事ができる。上述の無作為液中自己組織化法と組み合わせれば、迅速にバイオチップをパターン化基板に配置させる事が可能であるとともに、バイオチップの固定化位置も的確に把握する事ができるという利点を有する。

【0092】

【発明の効果】本発明のバイオチップ及びバイオチップアレイによると、多くの分析を同時に行えたと共に、微小化により試薬や試料の消費量の抑制や複合的情報の取得が期待されている。

【0093】本発明の識別子を有するバイオチップ及びバイオチップアレイによれば、バイオチップがパターン化基板上のどの位置に固定化されたかを把握することができるという有利な効果を奏する。

【0094】本発明のバイオチップ及びバイオチップアレイによると、固定化材料の種類の増加や固定化領域の微小化に際してもその作製工程が複雑にならず、生体材料の活性を損なうことなく固定化できるという有利な効果を奏する。

【0095】また、本発明のバイオチップ及びバイオチップアレイによると、液中でのパターン化疎水性膜と担体との疎水性相互作用力は他の作用力より優れていて、多項目測定用の高集積型DNAチップアレイとして応用可能な技術であるという有利な効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明のバイオチップアレイの構造の一例を示す図である。

【図2】 図2は、本発明において使用したタグの構成の一例を示す模式図(a, b)及びタグを付した微小担体の写真(c)である。

【図3】 図3は、微小担体にDNAを結合させる過程を示す図である。

【図4】 図4は、パターン化基板の作製工程の概要を示す図である。

【図5】 図5は、バイオチップの作製法の一例を示す図である。

【図6】 図6は、顕微鏡の外観を示す写真である。

【図7】 図7(a)は、被測定対象としてCR-1を、1  $\mu$ M、0.1  $\mu$ M、0.01  $\mu$ M、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、1 pMの濃度での蛍光強度の時間変化を調べた結果を示す。図7(b)は、濃度に対する蛍光強度の関係を示す。

【図8】 図8(a)は、種々の被測定対象を用いた場合の蛍光強度と時間との関係を示し、図8(b)は、種々の被測定対象を用いた場合の蛍光強度と濃度との関係を示す。

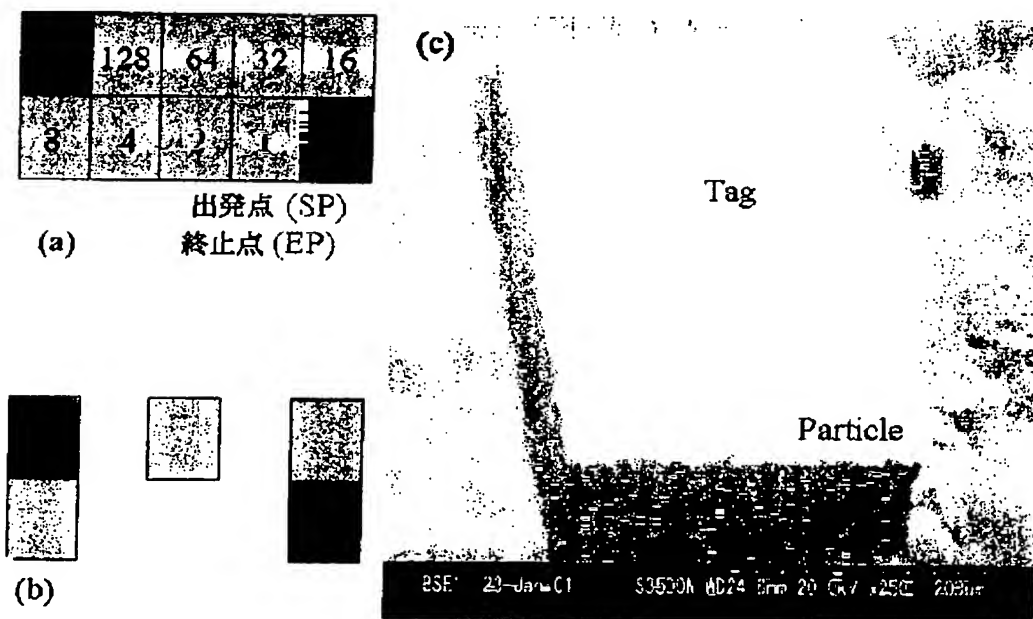
【図9】 図9は、親水性部位と疎水性部位を有するパターン化基板の写真である。

【図10】 図10は、無作為液中自己組織化を用いてタグを有する担体をパターン化基板上に配列させたDNAチップマイクロアレイの写真である。

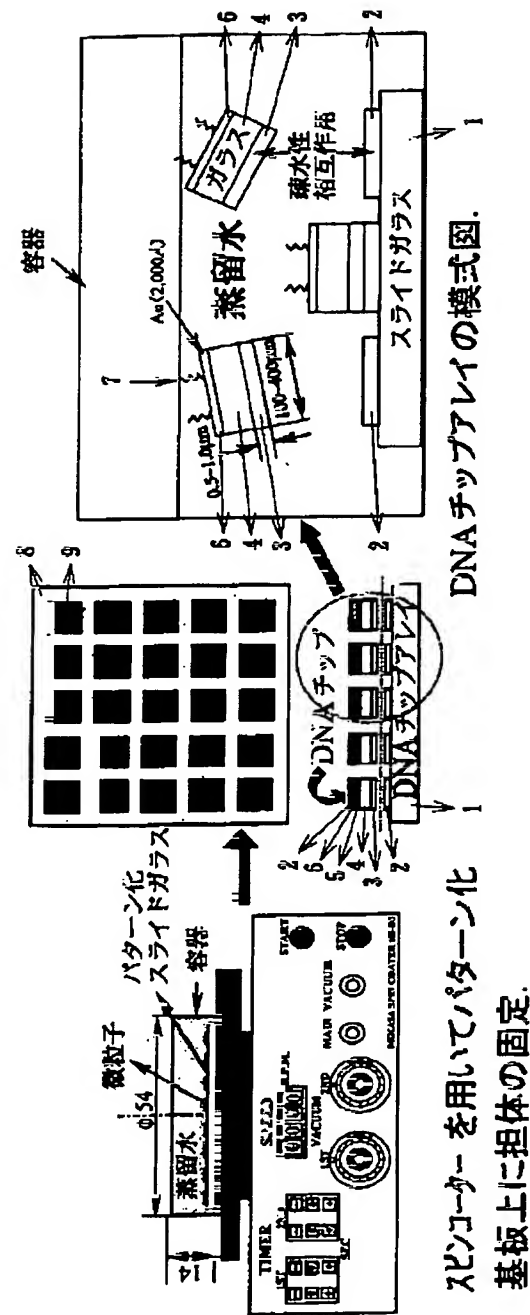
【符号の説明】

1 基板、2 固定部、3 疎水性コーティング、4 微小担体、5 クロムコーティング、6 金コーティング、7 認識物質、8 親水性部分、9 疎水性部分

【図2】

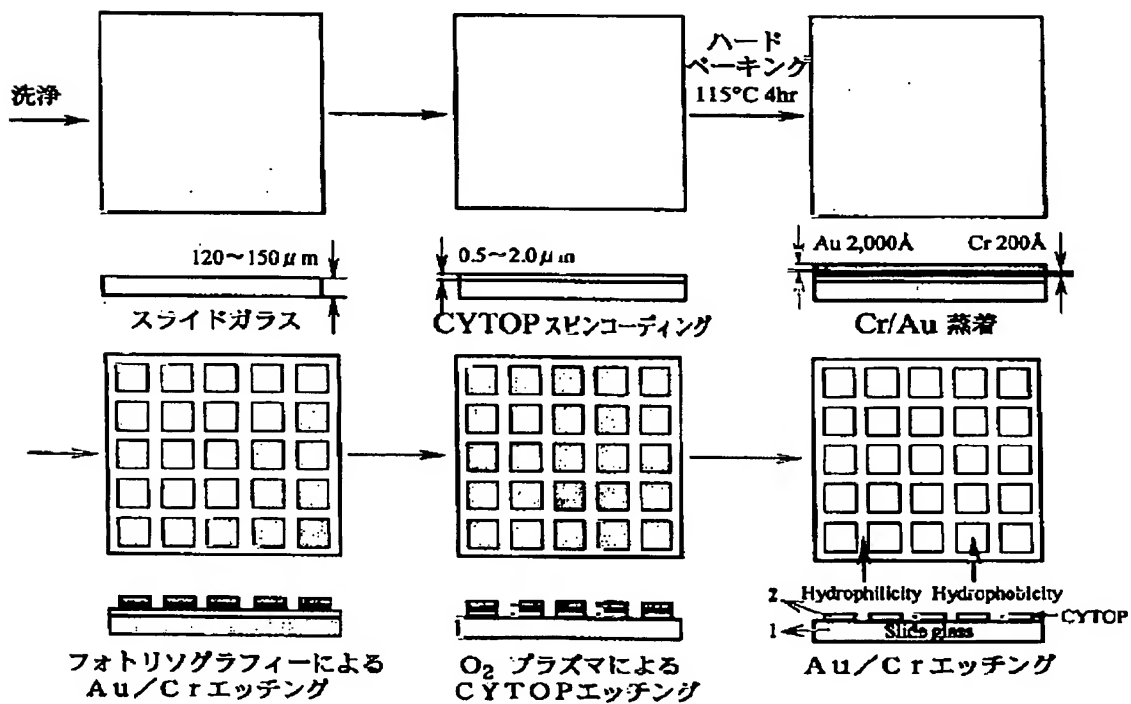


【図 1】

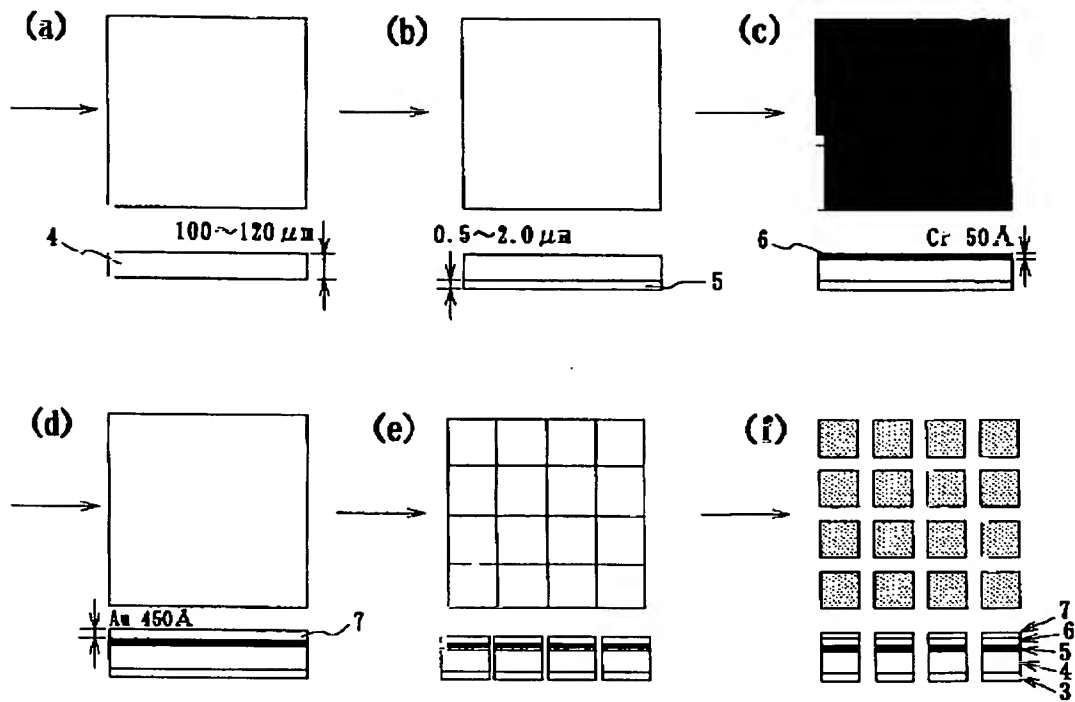


DNAチップアレイの模式図.

スピコンコーダーを用いてパターン化  
基板上に担体の固定.



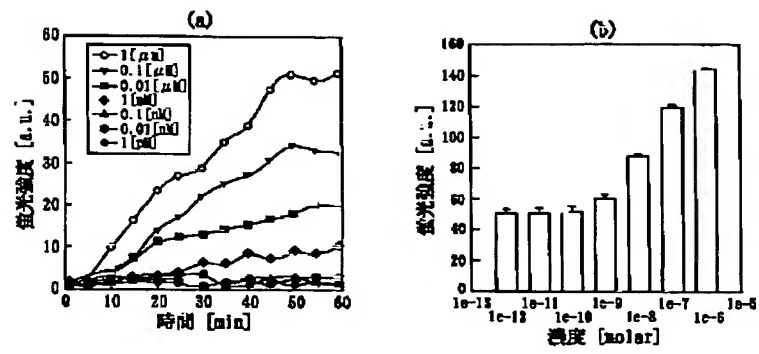
【図5】



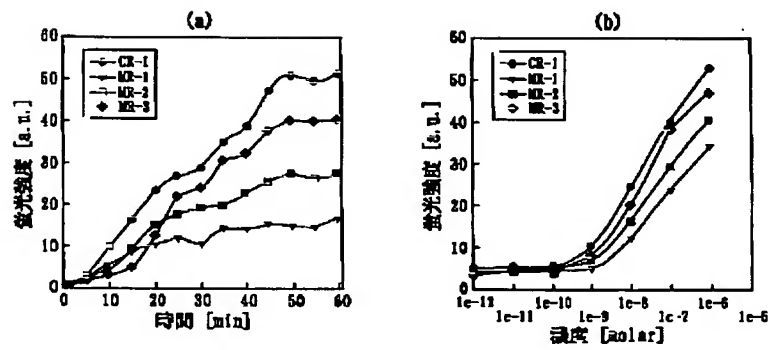
【図6】



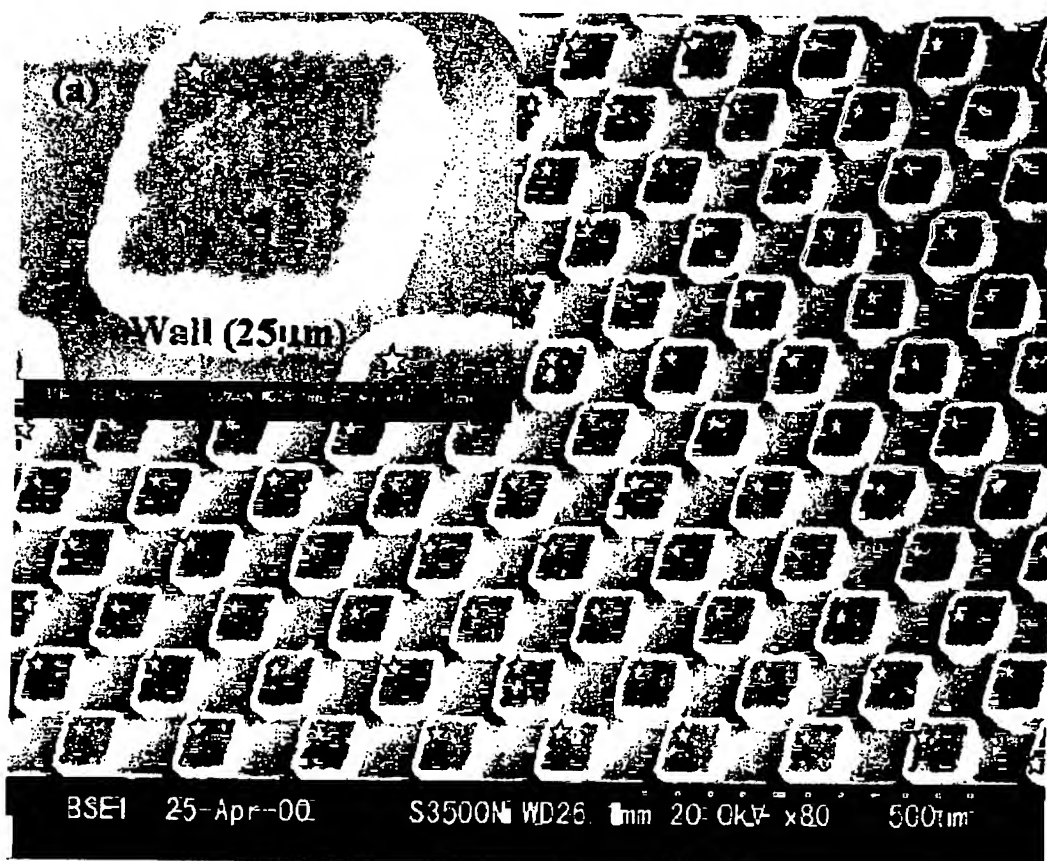
【 図 7 】



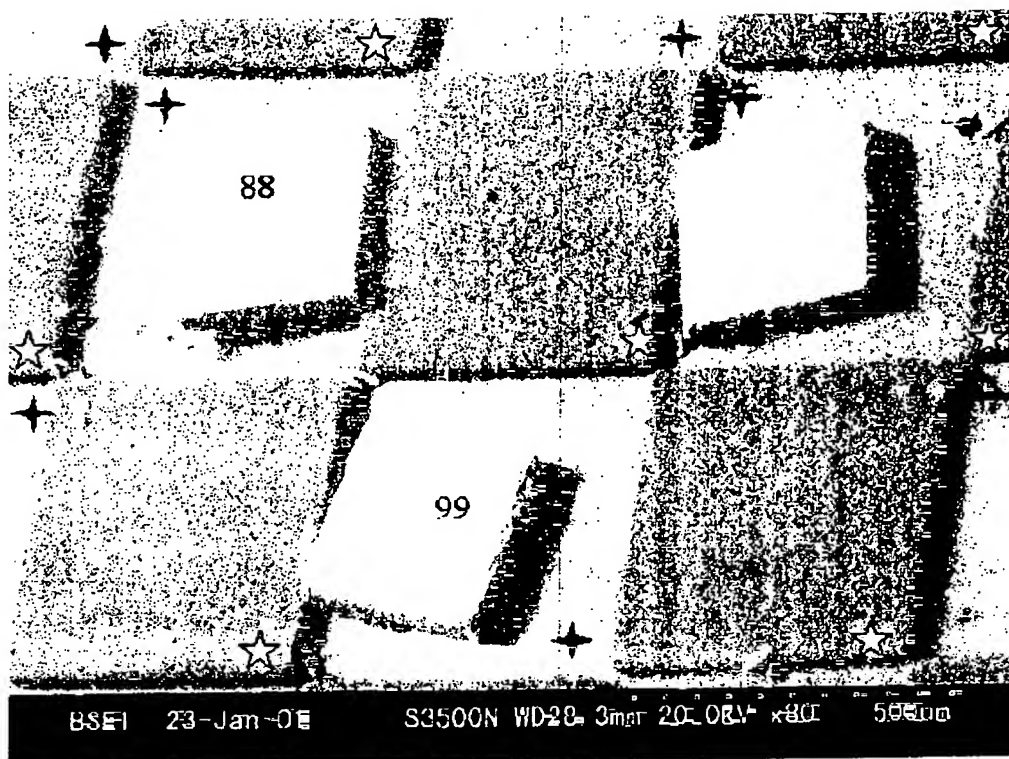
【 図 8 】



【図9】



【図10】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☒ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**